

PROCEDE DE FABRICATION DE NANOCAPSULES A PAROI A BASE DE PROTEINES RETICULEES; NANOCAPSULES AINSI OBTENUES ET COMPOSITIONS COSMETIQUES, PHARMACEUTIQUES ET ALIMENTAIRES EN COMPORTANT APPLICATION.

Publication number: FR2683159

Publication date: 1993-05-07

Inventor: ERIC PERRIER; ALAIN HUC

Applicant: COLETICA (FR)

Classification:

- international: A23L1/00; A23P1/04; A61K8/11; A61K8/31; A61K8/36; A61K8/37; A61K8/44; A61K8/49; A61K8/64; A61K8/65; A61K8/97; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; B01J13/00; B01J13/02; B01J13/14; A23L1/00; A23P1/04; A61K8/11; A61K8/30; A61K8/96; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; B01J13/00; B01J13/02; B01J13/06; (IPC1-7): A61K9/10; B01J13/14

- European: B01J13/14; A23L1/00P4; A23P1/04; A61K8/11F; A61K8/44; A61K8/49F2; A61K8/97; A61K9/51; A61Q19/00

Application number: FR19910013522 19911031

Priority number(s): FR19910013522 19911031

Also published as:

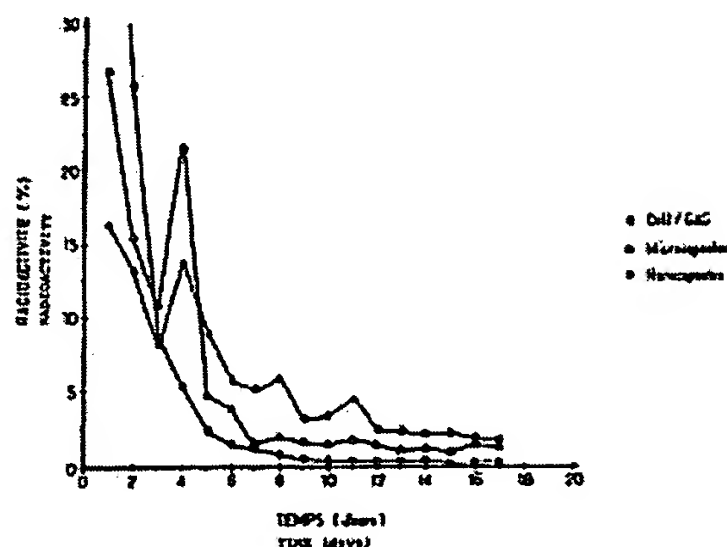
WO9308908 (A1)
EP0611326 (A1)
US6303150 (B1)
EP0611326 (A0)
CA2122260 (A1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract of FR2683159

A method for producing nanocapsules with cross-linked protein-based walls, comprising preparing emulsions of said proteins and cross-linking these with a cross-linking agent having reactive groups which react with the reactive groups of said proteins, particularly acylatable groups, to cause an interfaced cross-linking reaction between the proteins and the cross-linking agent, and thereby form capsules with walls based on the proteins cross-linked by the cross-linking agent. A fine emulsion of said proteins is prepared by adjusting the surface tension of the various liquid phases. Biocompatible and biodegradable nanocapsules having improved controlled release are thereby obtained.



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 683 159

(21) N° d'enregistrement national :

91 13522

(51) Int Cl⁵ : B 01 J 13/14, A 61 K 9/10

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 31.10.91.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : COLETICA Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : Perrier Eric et Huc Alain.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 07.05.93 Bulletin 93/18.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

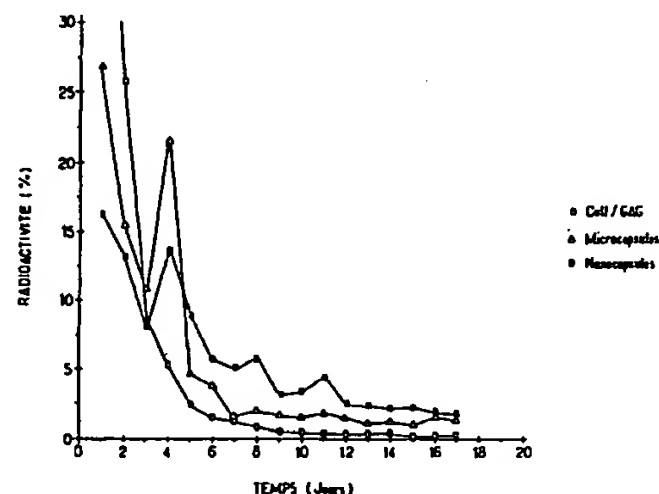
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Procédé de fabrication de nanocapsules à paroi à base de protéines réticulées; nanocapsules ainsi obtenues et compositions cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires en comportant application.

(57) L'invention concerne un procédé de fabrication de nanocapsules dont la paroi est à base de protéines réticulées.
Ce procédé comprend la préparation d'émulsions desdites protéines et une réticulation desdites protéines par un agent réticulant comprenant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes réactifs des protéines, en particulier des groupes acylables, de manière à réaliser une réaction de réticulation interfaciale entre les protéines et l'agent réticulant pour former des capsules dont la paroi est une paroi à base de protéines réticulées par l'agent réticulant, et caractérisé en ce que l'on prépare une émulsion très fine desdites protéines en ajustant la tension superficielle entre les phases liquides en présence.

On obtient ainsi des nanocapsules biocompatibles, biodégradables et offrant un meilleur effet retard.



FR 2 683 159 - A1



La présente invention concerne essentiellement un procédé de fabrication de nanocapsules à paroi à base de protéine réticulée ainsi que les nanocapsules ainsi obtenues et des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires en contenant.

05 On sait que l'encapsulation de substances actives est très importante en vue soit de protéger le principe actif, soit de permettre une libération lente ou différée du principe actif dans l'organisme.

10 On a proposé d'encapsuler les principes actifs dans des liposomes, les liposomes constituant une forme galénique enthousiasmante vue leur très bonne affinité avec les membranes cellulaires, leur très bonne biocompatibilité et leur taille submicronique.

15 Cependant, ces structures présentent de nombreuses limitations, voir même des inconvénients majeurs qui peuvent se résumer en les quatres points suivants :

- Un mauvais rendement d'encapsulation : les liposomes peuvent contenir ou véhiculer différents types de molécules : hydrophiles, lipophiles et amphiphiles. Cependant les rendements
20 d'encapsulation sont très faibles dans tous les cas, ce qui, couplé au problème de la diffusion des principes actifs, diminue encore l'efficacité des liposomes et ne permet pas, dans bien des cas, d'envisager leur utilisation dans des applications thérapeutiques.

- Une mauvaise reproductibilité des préparations liposomales lorsque des productions industrielles sont à mettre en
25 oeuvre.

- Une instabilité in vitro : elle peut se manifester de différentes façons : instabilité chimique des lipides, instabilité de la taille des liposomes, instabilité de leur structure,
30 formation d'agrégats, relargage des actifs encapsulés, etc ...

- Une instabilité in vivo : l'influence des liquides biologiques sur les liposomes augmente très souvent les perméabilités membranaires de ceux-ci. Selon la voie d'administration utilisée, les liposomes peuvent être au contact de liquides
35 biologiques aussi divers que le sang, les sucs digestifs, les

liquides interstitiels... et doivent par conséquent être capables de résister à de nombreuses interactions. Or, le contact avec la plupart des liquides biologiques conduit à une augmentation nette de la perméabilité membranaire des liposomes. Par fusion imparfaite
05 avec les cellules, ou par contact avec des sels, des enzymes, - lipases, phospholipases, acyl-transférases - des constituants plasmatiques, des sels biliaires, des sucs digestifs, ou par simples variations de pH, les liposomes peuvent relarguer de façon quasi instantanée leurs actifs dans le milieu environnant.

10 On a également proposé d'encapsuler les principes actifs dans des particules ou capsules de dimension de l'ordre de quelques microns. Par exemple, le déposant a proposé dans le document FR-A-2 642 329 la préparation de microcapsules à parois mixtes d'atélocollagènes et de glycosaminoglycannes pour l'encap-
15 sulation de principe actif. Cette méthode est tout-à-fait satisfaisante mais elle ne permet pas de préparer des capsules ayant une dimension submicronique, c'est-à-dire des capsules ayant une dimension nanométrique, dite nanoparticule.

Il a été proposé par ailleurs notamment par Couvreur
20 et al dans Febs Letters (1977), 84, 323-326 des nanocapsules à paroi en polyacrylamide et par les mêmes auteurs dans J. Pharm. Pharmacol. (1979), 31, 331-332 des nanocapsules à paroi de polyméthyle et polyéthyle cyanoacrylate. De même, il a été proposé dans EP-A-0 274 961 de préparer des nanocapsules formant des
25 systèmes colloïdaux à base d'un copolymère chlorure de vinyl et acétate de vinyl, de polyisobutylcyanoacrylate, de l'acide poly (d,l) lactique ; par polycondensation BEESTMAN et al ont proposé dans US-A-4 640 709 la préparation de sphères de petite taille dont les membranes sont constituées d'un matériel polymérique
30 comme le polyurée, le polyamide, le polysulfonamide, le polyester, le polycarbonate et le polyuréthane.

Cependant, bien qu'avec ces derniers documents on obtienne des capsules de taille nanométrique, un problème majeur réside dans le fait que ces particules ont généralement une mauvaise biocompati-
35 bilité, une mauvaise biodégradation in vitro et in vivo, pouvant

conduire au stockage d'une forte concentration de particules dans certains organes, à une toxicité de certains monomères ou de certains sous-produits de polymérisation ou de certains sous-produits de dégradation et à une mauvaise protection des principes actifs lorsqu'ils ne sont qu'adsorbés à la surface des nanoparticules donnant ainsi un effet retard insuffisant.

Ainsi, la présente invention a pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant la fabrication de particules de dimension nanométrique, dites nanoparticules, notamment sous forme de nanocapsules ou de nanosphères présentant une bonne biocompatibilité, une bonne biodégradation in vivo, une absence de toxicité ou une très faible toxicité, ainsi qu'une très bonne protection des principes actifs et un effet retard significatif.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique énoncé ci-dessus d'une manière simple, peu coûteuse, utilisable à l'échelle industrielle.

La présente invention permet pour la première fois de résoudre ces problèmes techniques d'une manière simple, peu coûteuse, fiable, utilisable à l'échelle industrielle et dans le domaine de la cosmétique, de la pharmacie, ou de l'agro-alimentaire, en obtenant des particules ou capsules de dimension submicronique, donc de taille inférieure à $1\text{ }\mu\text{m}$, et notamment comprise entre 100 et 800 nanomètres environ.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention fournit un procédé de fabrication de capsules de très faible dimension, dites nanocapsules, à paroi à base de protéines réticulées, comprenant la préparation d'une émulsion desdites protéines et une réticulation desdites protéines par un agent réticulant comprenant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes réactifs desdites protéines, en particulier des groupes acylables, de manière à réaliser une réaction de réticulation interfaciale entre les protéines et l'agent réticulant pour former des capsules dont la paroi est une paroi à base de protéines réticulées par l'agent réticulant, caractérisé en ce que l'on prépare une émulsion très fine desdites protéines en diminuant la

différence de viscosité entre les phases liquides en présence.

05 Selon une variante de réalisation, ce procédé est caractérisé en ce qu'on diminue la différence de viscosité entre les phases liquides en présence par l'ajout d'un agent modificateur de viscosité dans l'une des deux phases.

10 Selon une autre variante de réalisation, ce procédé est caractérisé en ce que l'agent modificateur de viscosité est capable de modifier la viscosité d'au moins 4 fois et de préférence d'au moins 10 fois, par rapport à la phase à laquelle ledit agent est ajouté.

15 Selon une autre variante, ce procédé est caractérisé en ce que, dans le cas de la formation d'une émulsion eau-dans-huile, ledit agent modificateur de viscosité est ajouté ou substitué à la phase huileuse de manière à augmenter la viscosité d'au moins 4 fois par rapport à la viscosité de la phase huileuse utilisée classiquement.

20 Selon une autre variante, ce procédé est caractérisé en ce que dans le cas d'une émulsion huile-dans-eau, on diminue la viscosité de la phase aqueuse soit en diminuant la proportion en protéine, soit en ajoutant un agent modificateur de viscosité dans la phase aqueuse (agent fluidifiant de viscosité) de manière à diminuer sa viscosité et de préférence d'au moins 4 fois par rapport à la viscosité de la phase aqueuse utilisée classiquement.

25 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que l'on utilise comme protéine une protéine à effet filmogène, de préférence choisie parmi le groupe consistant d'une protéine animale telle que élastine, kératine, soie, albumine, protéines du lait, protéines de structure telles que collagène, notamment collagène sans télopeptide ou atélocollagène ou un glycosamino-
30 glycanne ; une protéine végétale telle que protéine de blé, de maïs, d'avoine, d'amande ; et une protéine issue du milieu marin notamment extraite de poissons, d'algues ou encore du plancton ou microplancton.

35 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce

que la protéine précitée a un poids moléculaire au moins égal à 50 000 Daltons, cette protéine étant utilisée seule ou en mélange.

05 Selon une autre variante, ce procédé est caractérisé en ce que la proportion de protéine dans la solution d'émulsion varie entre 0,1 et 5 % en poids par rapport au poids total de l'émulsion.

Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que la protéine est tout d'abord dissoute dans une solution aqueuse tamponnée ayant un pH légèrement basique, de préférence compris entre environ 7,5 et environ 10,5.

10 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que l'agent modificateur de viscosité précité est une huile visqueuse, en particulier choisie parmi l'huile de vaseline visqueuse, dont la viscosité est de préférence d'au moins 80 cp, de préférence encore d'au moins 200 cp ; ou un agent modificateur
15 de viscosité des huiles telles que le stéarate de magnésium.

Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que, lors de l'étape d'émulsion, on utilise un agent tensioactif ou émulsionnant capable de former une nanoémulsion, de préférence du glycérol sorbitan hydroxyisostéarate.

20 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que l'étape d'émulsion est réalisée sous une agitation à effet cisailant, de préférence à au moins 20 000 tr/min, ou à effet de cavitation.

25 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que l'on réalise une émulsion très fine en passant l'émulsion dans un homogénéiseur sous une pression d'au moins 400 bars, cet homogénéiseur étant de préférence une presse French.

Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que la protéine précitée comprend du collagène.

30 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que la protéine précitée comprend de l'atélocollagène.

Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que la protéine précitée comprend un mélange d'atélocollagène et de glycosaminoglycane.

35 Selon une autre variante ce procédé est caractérisé en ce que l'une des phases contient un principe actif cosmétique ou

pharmaceutique, ou alimentaire, hydrosoluble, liposoluble, ou insoluble.

05 Selon encore une autre variante de réalisation, dans le cas de l'emploi d'une substance active hydrosoluble, on utilise un rapport d'émulsification huile/eau voisin de 6.

10 Selon une autre variante de réalisation, pour le cas où l'on utilise un principe actif liposoluble, on utilise une protéine à haut ou très haut poids moléculaire, c'est-à-dire d'au moins 50 000 Daltons, à une concentration telle que la viscosité de la solution obtenue soit faible, c'est-à-dire inférieure à 20 cp.

D'autre part, dans ce cas, on préfère utiliser un rapport d'émulsification eau/huile voisin de 20.

15 Par ailleurs, on emploie dans le cadre du procédé, tout agent réticulant bien connu de l'homme de l'art, tel que décrit notamment dans FR-A-2 642 329.

20 Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre également les capsules de très faible dimension, dites nanocapsules, caractérisées en ce qu'elles comprennent une paroi en protéine réticulée, de préférence préparées par le procédé tel que précédemment défini.

25 Puis représentée selon un troisième aspect, la présente invention couvre également une composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend des nanocapsules à paroi à base de protéines réticulées, de préférence obtenues par le procédé précédemment défini. De préférence, ces nanocapsules contiennent au moins en partie un principe actif, en particulier un principe actif cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, hydrosoluble, liposoluble ou insoluble.

30 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaitront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à divers exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés
35 en poids sauf indication contraire.

Exemple 1 selon l'inventionPréparation de nanocapsule à paroi en protéines à base d'un mélange atélocollagène/glycosaminoglycannes05 a) Fabrication du mélange nécessaire à la fabrication des nano-
capsules

Ce mélange est préparé selon une procédure décrite dans FR-A-2 642 329, exemple 1 étapes a) à c).

10 - A partir de peaux de veaux fraîchement abattus, le collagène est extrait puis les télopeptides sont éliminés pour obtenir de l'atélocollagène.

- A partir de cloisons nasales de veaux, le chondroïtine 4 sulfate est extrait, dialysé puis lyophilisé.

15 - Les deux préparations précédentes sont avantageusement placées en tampon basique tel que carbonate ou phosphate ou tout autre substance permettant d'obtenir un pouvoir tampon entre 7,5 et 10,5. Puis les solutions sont mélangées de manière à obtenir par exemple, les concentrations finales suivantes :

	Atélocollagène :	1,6 %
20	Chondroïtine 4 sulfate :	0,6 %
	Carbonate de sodium anhydre :	4,8 %
	Parahydroxybenzoate de méthyle :	0,4 %
	Eau permutée :	qsp

25 Le pH de l'ensemble est porté entre 7,5 et 10,5, par exemple à 8,5, par ajout de HCl, 6N ou de NaOH, 6N.

Un kilo de cette solution ainsi préparée est utilisé dans la suite de la fabrication.

b) Préparation de l'agent réticulant

30 400 g de chlorure de téréphtaloyle sont broyés dans un mortier et sont rajoutés à 1 l de vaseline visqueuse CODEX. L'ensemble est agité par agitation mécanique.

c) Emulsification

35 Dans une cuve inox réfrigérée, sont introduits 6 l

d'huile de vaseline visqueuse CODEX d'indice de viscosité 250 cp et de préférence 320 ml d'un tensioactif par exemple le glycérol sorbitan hydroxyisostéarate (Arlacel 780, ICI). L'ensemble est agité pendant quelques minutes.

05 La solution d'atélocollagène et de chondroïtine sulfate préparée est alors ajoutée et l'émulsification est réalisée en quelques minutes à 20 000 rpm à l'aide d'un Ultra-Turax^R.

d) Réticulation

10 La solution contenant l'agent réticulant préparé à l'étape b est alors introduite dans l'émulsion. Les particules solides présentes dans celle-ci sont rajoutées également, et se dissoudront au cours du temps.

Après 5 min d'agitation à 20 000 rpm à l'Ultra-Turax^R, la
15 solution est mise sous agitation mécanique à vitesse de rotation réduite, pendant 18 h au moins.

Les nanocapsules sont séparées par centrifugation en discontinu et le surnageant est éliminé (4000 rpm pendant 15 min).

20 e) Lavages

Les nanocapsules sont lavées par cinq solutions successives d'une phase organique miscible avec l'huile de vaseline. Citons pour exemples le DRAGOXAT^R (DRAGOCO), le MYRISTATE D'ISOPROPYLE (STEARINIERIE DUBOIS), les triglycérides (STEARINIERIE
25 DUBOIS), etc.

Au cours de chaque lavage, 100 ml de nanocapsules sont rajoutés à 500 ml de phase organique. L'ensemble est agité pendant quelques minutes puis centrifugé (4000 rpm pendant 15 min).

Les nanocapsules obtenues peuvent être mises en
30 suspension par exemple dans des gels de protéine ou de polysaccharide, ou dans une phase huileuse.

Exemple 2 de l'invention

Préparation de nanocapsules contenant un principe actif
35 hydrosoluble ou insoluble

On procède comme décrit à l'exemple 1 si ce n'est qu'à la solution fabriquée en a) on peut rajouter de nombreux principes actifs, comme par exemple :

Ex 2A : 64 g de GLYCENTANE^R (Bioética)

05 Ex 2B : 64 g de GINKGO BILOBA (Alban Muller Int.)

Ex 2C : 32 g de GLUCOSE (MERCK)

Ex 2D : 32 g d'un acide aminé tel que la L-Glutamine

Ex 2E : 32 g de CAFEINE (SIGMA).

10 Exemple 3 de l'invention

Préparation de nanocapsules à paroi en protéines à base d'atélocollagène

On procède comme décrit à l'exemple 1. Cependant, on utilise comme seule protéine macromoléculaire, l'atélocollagène à
15 une concentration de 2 %.

Exemple 4 de l'invention

Nanocapsules à l'élastine

On procède comme décrit à l'exemple 1 si ce n'est que
20 l'on utilise comme protéine de l'élastine.

On peut également choisir une protéine parmi les protéines animales telles qu'élastine, kératine, soie, albumine, protéines du lait, les protéines végétales telles que protéines de blé, de maïs, d'avoine, d'amande ou les protéines issus du milieu
25 marin telles que collagène ou autres protéines extraits de poissons, protéines d'algues, microplancton.

Exemple 5 de l'invention

Tous les exemples décrits précédemment peuvent être
30 modifiés en utilisant d'autres méthodes d'émulsification.

Ainsi, dans l'exemple 1 en particulier, l'étape d'émulsification c) est modifiée et après un léger brassage par agitation mécanique, l'ensemble est passé une ou plusieurs fois dans un homogénéisateur haute pression.

35 Les pressions utilisées peuvent se situer entre 400 et

1000 bars mais se situent préférentiellement autour de 700 bars. Les homogénéisateurs simple et double effets peuvent être utilisés indifféremment mais les simples seront préférés pour des protéines très filmogènes.

05 Les exemples d'homogénéisateurs haute pression qui ont été utilisés sont le Lab 60 (APV), le SHL 05 (ALPHA-LAVAL), ou le SODEXIM 2720 ou 2735 (SODEXIM). Après un traitement d'homogénéisation à 700 bars par exemple, on obtient des nanocapsules ayant une dimension inférieure à 1 μm , comprise entre
10 200 et 800 nanomètres.

De même, d'autres appareils utilisant d'autres principes, peuvent également permettre l'obtention de forces de cavitation élevées. A l'aide de celles-ci, il est alors possible d'obtenir des nanoémulsions (exemples : SONICATEUR^R BRANDSON,
15 SONOLATOR^R de SONIC Corp.).

Exemple 6 de l'invention

Dans l'étape d'émulsification de l'exemple 1, on utilise un agent viscosant des huiles pour augmenter la viscosité de
20 la solution d'émulsification par exemple le stéarate de magnésium à une proportion de 2 % en poids. On obtient des nanocapsules de dimension comprise entre 200 et 800 nanomètres.

Exemple 7

25 Préparation de nanocapsules contenant des actifs lipo-solubles

a) A 250 ml de la solution décrite dans l'exemple 1 en a), on rajoute 750 ml d'eau déminéralisée.

30 b) On rajoute à 25 ml d'huile de bourrache, 5 ml de dichlorure de sébacoyl et on mélange l'ensemble par agitation mécanique.

c) Les solutions a) et b) sont additionnées en continu et envoyées dans un homogénéisateur haute pression du type Lab 60 (APV). Les
35 pressions d'homogénéisation utilisées sont comprises entre 300 et

1000 bars, par exemple 800 bars, et plusieurs homogénéisations successives ont été effectuées, avec des valves simple et double effets. Les sphères obtenues sont de taille inférieure à un micron, sont remarquablement stables et vu leur faible taille ne
05 décanter pas dans un milieu dilué de stockage.

Exemple 8

Autres actifs liposolubles

Dans l'exemple 7, les 25 ml d'huile de bourrache peuvent
10 être substitués par :
Ex 8a : 25 ml myristate d'éthyle
Ex 8b : 25 ml myristate d'isopropyle
Ex 8c : 25 ml d'huile de vaseline fluide
Ex 8d : 25 ml d'oléate d'éthyle
15 Ex 8e : 25 ml d'acétate de vitamine E
Ex 8f : 25 ml de benzoate de benzyle.

Exemple 9

Test d'objectivation

20 Relargage in vivo d'une substance encapsulée dans des nanocapsules selon l'invention par rapport à des microcapsules.

Les résultats des tests d'objectivation les plus convaincants fournis par les nanocapsules sont incontestablement ceux liés à une modification de la distribution spatio-temporelle de la
25 substance active. Cette modification peut être liée à la taille des particules qui sont alors spécifiquement véhiculées dans certaines parties de l'organisme (système réticulo-endothélial, tissus hépatiques), mais elle peut être également liée au rôle de réservoir à actifs que peuvent jouer les nanocapsules. Dans ce
30 dernier cas, un relargage temporisé de l'actif peut permettre d'atteindre une forte biodisponibilité du principe actif, une assimilation plus intense, ainsi qu'une élimination beaucoup plus progressive des déchets issus de la métabolisation du principe actif.

35 L'étude comparative décrite ci-dessous a permis aux

inventeurs d'évaluer la présence et l'intensité de l'effet retard, obtenu avec des capsules de taille micrométrique et avec des capsules de taille nanométrique selon l'invention.

05 a) Matériels et méthodes

La peau dorsale de rats (WISTAR mâles, environ 300 g), a été traitée à l'aide d'une émulsion eau dans huile, la phase huileuse étant de l'huile de vaseline visqueuse codex d'indice de viscosité d'environ 250 cp (TISCO) et la phase aqueuse étant représentée par l'une ou l'autre des solutions ci-dessous :

- 10 - un mélange collagène/glycosaminoglycane (en abrégé Coll/GAG) renfermant de l'acide para-aminobenzoïque radioactif (PABA*)
- des microcapsules de type A renfermant du PABA* (taille moyenne 50 µm) telles que préparées selon la méthode décrite à l'exemple 1
- 15 du brevet FR-A-2 642 329
- des nanocapsules renfermant du PABA* (taille comprise entre 100 et 800 nm) préparées selon la méthode de l'exemple 1 ci-dessus.

Après application sur une surface constante, du produit à tester, la libération de l'acide a été suivie par mesure de la radioactivité contenue dans l'urine récoltée quotidiennement pour chaque animal.

Pour chacune des trois solutions décrites ci-dessus, deux rats ont été traités par 0,3 g d'émulsion, possédant une radioactivité spécifique voisine de $3 \cdot 10^6$ cpm/g dans le cas de la solution collagène/GAG et des microcapsules, et voisine de $6 \cdot 10^5$ cpm/g dans le cas des nanocapsules de l'invention.

b) Résultats

Après application du composé radioactif, encapsulé ou non encapsulé, la radioactivité a été mesurée chaque jour dans l'urine des rats. Les courbes montrant l'évolution de cette radioactivité en fonction du temps (en jours) sont représentées sur la figure 1.

Les valeurs rapportées sur ce graphique représentent la radioactivité mesurée dans les urines, divisée par la radioactivité totale récupérée dans les urines et dans la peau. Cette radioacti-

vité totale récupérée est comptabilisée après les 17 jours de mesures et après sacrifice des animaux.

05 Ce graphique décrit l'effet retard observé avec les microcapsules et les nanocapsules sur le relargage du PABA*. Le fort relargage des premiers jours, constaté avec la solution de collagène/GAG est moins intense avec les microcapsules et très faible avec les nanocapsules. Le PABA* s'élimine beaucoup plus lentement lorsqu'il est encapsulé dans les microcapsules et encore moins rapidement lorsqu'il est encapsulé dans les nanocapsules.

10 17 jours après le traitement, les rats sont sacrifiés, la peau ayant reçue l'application est hydrolysée, puis la radioactivité est mesurée. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans la figure 2 et montrent que la radioactivité contenue dans les tissus cutanés est faible (voisine de 4 %) lorsque le PABA* n'a pas
15 été encapsulé, beaucoup plus forte (voisin de 10 %) lorsque des microcapsules ont été utilisées, et encore plus intense (> 20 %) lorsque des nanocapsules ont encapsulé la substance radioactive.

Cette différence très nette a été confirmée dans une autre expérience qui a été menée où des rats nus mâles de 300 g
20 ont été utilisés dans le même type d'expérimentation.

c) Conclusions

- La vitesse d'élimination de la radioactivité retrouvée dans les urines étant directement reliée à la vitesse de
25 l'absorption cutanée, tout retard dans l'élimination peut être considéré comme étant dû à l'effet retard des sphères encapsulant l'élément radioactif. Cet effet retard constaté in vivo sur le rat est très net avec des microcapsules de 50 µm mais est encore plus intense avec des nanocapsules (dont la taille varie entre 800 nm et
30 100 nm).

- La radioactivité mesurée au niveau du tissu cutané, après application d'un élément radioactif, encapsulé ou non, est une mesure de la biodisponibilité de cet élément, c'est-à-dire de sa capacité à être intégré dans le métabolisme cutané. Après appli-

cation d'une quantité trop forte de PABA^{*}, l'élimination est très rapide, les tissus cutanés ne pouvant accepter qu'une fraction aliquote du produit appliqué.

05 Lorsque des microcapsules ou des nanocapsules sont utilisées, il y a relargage temporisé de PABA^{*} qui peut alors être métabolisé en de plus grandes quantités dans les tissus cutanés.

C'est ce que l'on observe avec les nanocapsules de l'invention et dans une moindre mesure avec les microcapsules.

10 Si la taille des capsules est suffisamment petite pour qu'il n'y ait pas éclatement lors de l'application (diamètre inférieur à 100 μ m), il est donc possible d'obtenir grâce aux nanocapsules une amélioration de la biodisponibilité des actifs cosmétiques.

15 La présente invention couvre tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits. En particulier, dans la description et les revendications, le mot "nanocapsule" n'est pas limité à des capsules proprement dites mais couvre des sphères ou des particules dont la dimension est nanométrique.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication de capsules de très faible dimension, dites nanocapsules, à paroi à base de protéines réticulées, comprenant la préparation d'une émulsion desdites
05 protéines et une réticulation desdites protéines par un agent réticulant comprenant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes réactifs desdites protéines, en particulier des groupes acylables, de manière à réaliser une réaction de réticulation
10 interfaciale entre les protéines et l'agent réticulant pour former des capsules dont la paroi est une paroi à base de protéines réticulées par l'agent réticulant, caractérisé en ce que l'on prépare une émulsion très fine desdites protéines en diminuant la différence de viscosité entre les phases liquides en présence.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce
15 qu'on diminue la différence de viscosité entre les phases liquides en présence par l'ajout d'un agent modificateur de viscosité dans l'une des deux phases.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce
20 que l'agent modificateur de viscosité est capable de modifier la viscosité d'au moins 4 fois et de préférence d'au moins 10 fois, par rapport à la phase à laquelle ledit agent est ajouté.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 à 3, caracté-
risé en ce que dans le cas de la formation d'une émulsion eau-dans-
huile, ledit agent modificateur de viscosité est ajouté ou
25 substitué à la phase huileuse de manière à augmenter la viscosité d'au moins 4 fois par rapport à la viscosité de la phase huileuse utilisée classiquement.

5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caracté-
risé en ce que dans le cas d'une émulsion huile-dans-eau, on
30 diminue la viscosité de la phase aqueuse soit en diminuant la proportion en protéine, soit par l'ajout d'un agent modificateur de viscosité de manière à diminuer sa viscosité, de préférence d'au moins 4 fois, par rapport à la viscosité de la phase aqueuse utilisée habituellement.

35 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, carac-

térisé en ce que l'on utilise comme protéine une protéine à effet filmogène, de préférence choisie parmi le groupe consistant d'une protéine animale telle que élastine, kératine, soie, albumine, protéines du lait, protéines de structure telles que collagène, notamment collagène sans télopeptide ou atélocollagène ou un glycosaminoglycane ; une protéine végétale telle que protéine de blé, de maïs, d'avoine, d'amande ; et une protéine issue du milieu marin notamment de poissons ou d'algues ou encore du plancton ou microplancton.

10 7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que la protéine précitée a un poids moléculaire au moins égal à 50 000 Daltons, cette protéine étant utilisée seule ou en mélange.

15 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la proportion de protéine dans la solution d'émulsion varie entre 0,1 et 5 % en poids par rapport au poids total de l'émulsion.

20 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la protéine est tout d'abord dissoute dans une solution aqueuse tamponnée ayant un pH légèrement basique, de préférence compris entre environ 7,5 et environ 10,5.

25 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent modificateur de viscosité précitée est une huile visqueuse, en particulier choisie parmi l'huile de vaseline visqueuse, dont la viscosité est de préférence d'au moins 80 cp, de préférence encore d'au moins 200 cp ; ou un agent modificateur de viscosité des huiles tel que le stéarate de magnésium.

30 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que, lors de l'étape d'émulsion, on utilise un agent tensioactif ou émulsionnant capable de former une nanoémulsion, de préférence du glycérol sorbitan hydroxyisostéarate.

35 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'étape d'émulsion est réalisée sous une agitation à effet cisailant, de préférence à au moins 20 000 tr/min, ou à

effet de cavitation.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'on réalise une émulsion très fine en passant l'émulsion dans un homogénéiseur sous une pression d'au moins
05 400 bars, cet homogénéiseur étant de préférence une presse French.

14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la protéine précitée comprend du collagène.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la protéine précitée comprend de l'atélocollagène.

10 16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la protéine précitée comprend un mélange d'atélocollagène et de glycosaminoglycane.

17. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'une des phases contient un principe actif
15 cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, hydrosoluble, liposoluble ou insoluble.

18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que lorsque le principe actif est hydrosoluble ou insoluble, on utilise un rapport d'émulsion huile/eau voisin de 6.

20 19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que lorsque le principe actif est liposoluble, on utilise un rapport d'émulsion eau/huile voisin de 20.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, 19, caractérisé en ce qu'on utilise une protéine à haut poids moléculaire au moins égale à 50 000 Daltons, la concentration de la protéine est telle que la viscosité de la solution aqueuse obtenue soit relativement faible.

21. Capsule de très faible dimension, dite nanocapsule, caractérisée en ce qu'elle comprend une paroi en protéine réticulée et présente une dimension inférieure à 1 μ m, de préférence préparée par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

22. Composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend des nanocapsules telles
35 que préparées par le procédé selon l'une quelconque des revendica-

tions 1 à 20, ou telles que définies à la revendication 21, de préférence contenant un principe actif, cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, hydrosoluble, liposoluble ou insoluble.

FIG.1

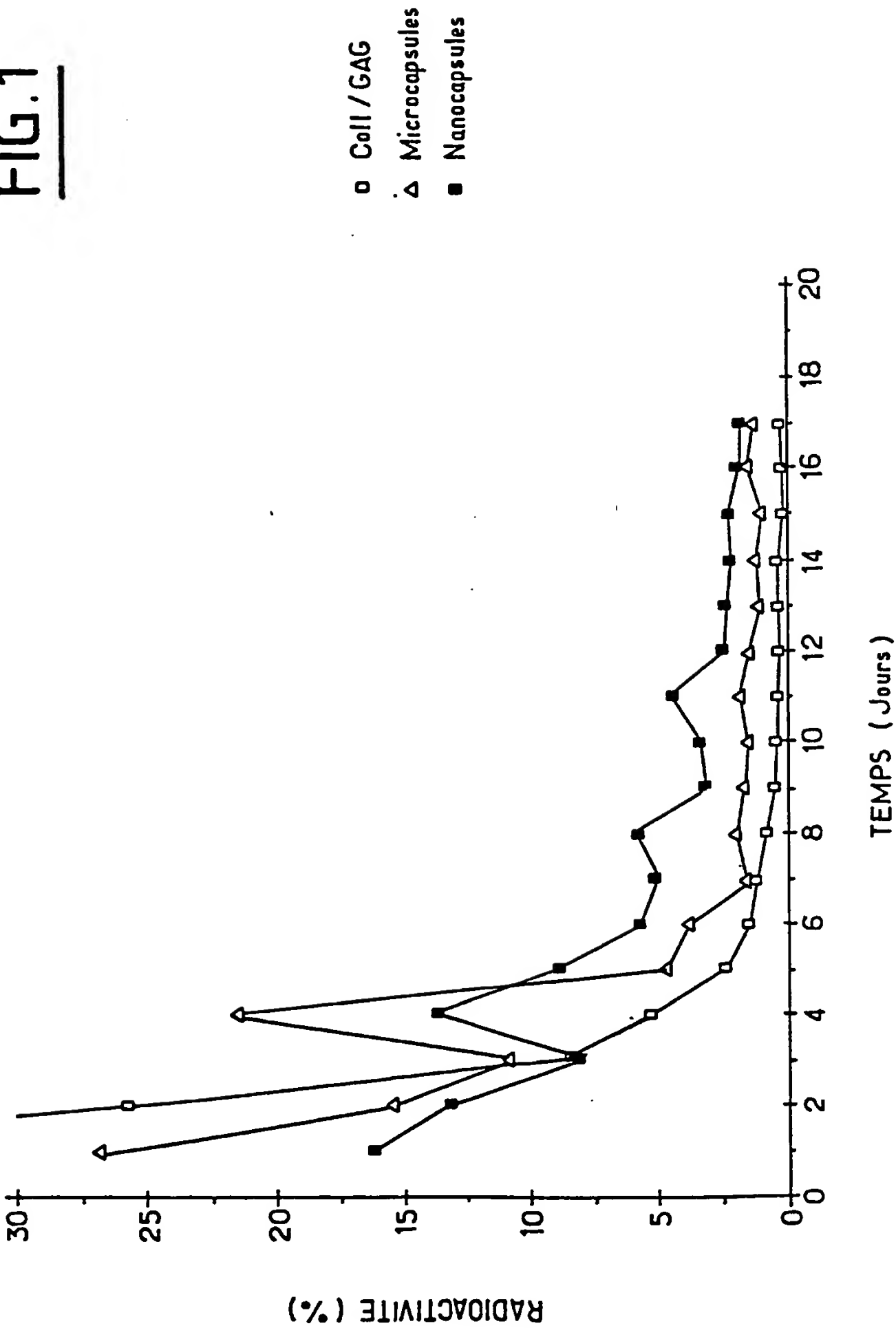
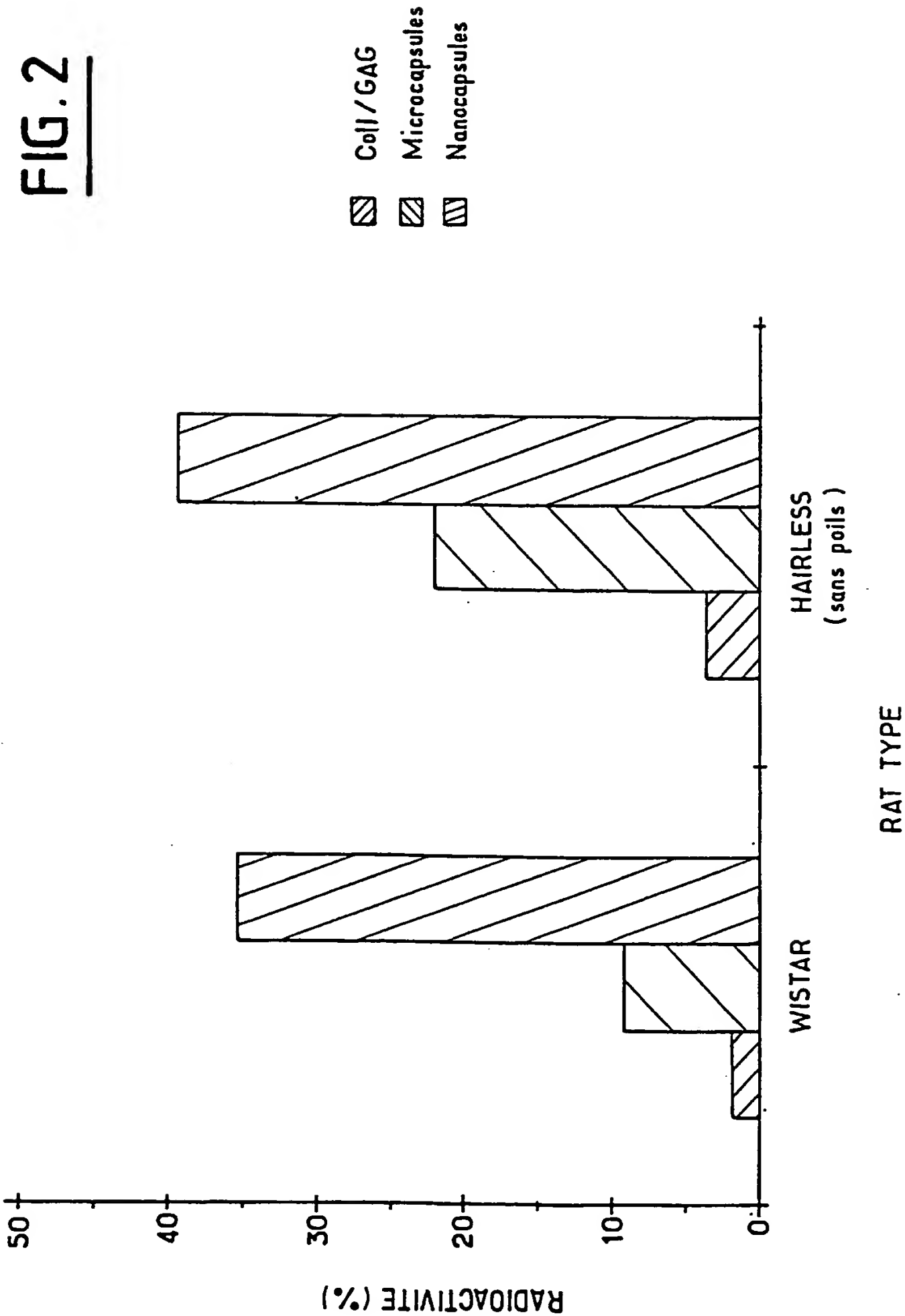


FIG. 2



REPUBLIQUE FRANÇAISE

2683159

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9113522
FA 468911

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE vol. 14, no. 2, 1 Octobre 1990, AMSTERDAM pages 111 - 131; REZA ARSHADY: 'ALBUMIN MICROSPHERES AND MICROCAPSULES: METHODOLOGY OF MANUFACTURING TECHNIQUES'	1
A	AU-A-495 261 (PHARMACEUTICAL SOCIETY OF VICTORIA AND PETER SPEISER)	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		B01J A61K
Date d'achèvement de la recherche 10 SEPTEMBRE 1992		Examinateur PYFFEROEN K.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		